Aus der medizinischen Poliklinik der Universität Basel
Vorsteher: Prof. Dr. A. Gigon

Experimentelle Untersuchung über die Wirkung des Alt-Tuberkulins auf die Kohlensäure-Ausscheidung von Ratten und Meerschweinchen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der medizinischen Fakultät
der Universität Basel

vorgelegt von

Maria Elisabeth KATZ
aus Berlin

PHILOGRAPHISCHER VERLAG / BASEL 1935

Aus der medizinischen Poliklinik der Universität Basel
Vorsteher: Prof. Dr. A. Gigon

Experimentelle Untersuchung über die Wirkung des Alt-Tuberkulins auf die Kohlensäure-Ausscheidung von Ratten und Meerschweinchen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der medizinischen Fakultät
der Universität Basel

vorgelegt von

Maria Elisabeth KATZ
aus Berlin

PHILOGRAPHISCHER VERLAG / BASEL 1935

Von der medizinischen Fakultät Basel genehmigt auf Antrag von Prof. Dr. A. Gigon.

Tag der Promotion: 16. Mai 1935.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Experimentelle Untersuchung über die Wirkung des Alt-Tuberkulins auf die Kohlensäure-Ausscheidung von Ratten und Meerschweinchen

Das Tuberkulin wird heute zur Diagnostik und Therapie der Tuberkulose an allen Kinder-, Haut- und Medizinischen Kliniken verwendet. Seit seiner Entdeckung im Jahre 1882 durch Robert Koch sind viele verschiedene Tuberkulinarten hergestellt worden, die alle das gemeinsam haben, dass sie aus den zerriebenen Leibern der Tuberkelbazillen oder ihren Stoffwechselprodukten bestehen. Wie alle diese Tuberkuline wirken, an welcher Stelle im Organismus sie ihre Aktivität entfalten, darüber bestehen viele Theorien; sicheres ist nicht bekannt.

Diese Arbeit soll sich mit der Wirkung des Alttuberkulins auf den Basalstoffwechsel beschäftigen. Verschiedene Forscher haben bereits eine Steigerung des Grundumsatzes nach Tuberkulininjektionen beobachtet. Es entstand so die Frage, ob diese Erscheinung auf eine einfache Eiweissnatur des Tuberkulins zurückzuführen sei, oder ob hier eine spezifische Wirkung des Toxins vorlänge. Nach den neusten Untersuchungen amerikanischer Forscher ist der wirksame Stoff im Tuberkulin ein Eiweisskörper, ein Bestandteil der Bazillenleiber, der bei der Kultur allmählich in den flüssigen Nährboden übergeht. Trotzdem kann der Stoffwechselsteigerung nach Tuberkulininjektionen nicht nur eine einfache Eiweisswirkung zu Grunde liegen. V. Frisch erzielte wiederholt bei seinen tuberkulösen Patienten nach Tuberkulininjektionen einen Anstieg der Grundumsatzkurve, die ihren Gipfelpunkt nach 24 Stunden oder mehr erreichte, während nach Proteinkörperinjektionen das Maximum schon nach 8—10 Stunden überschritten war. Auch aus den unten beschriebenen Ver-

suchen wird hervorgehen, dass es sich bei der Wirkung des Tuberkulins auf den Grundumsatz um einen spezifischen Vorgang handeln muss.

Bisher sind Messungen des Grundumsatzes nach Tuberkulininjektionen nur am Menschen, und zwar am tuberkulösen Patienten vorgenommen worden. Das Resultat war gewöhnlich eine Stoffwechselsteigerung, die man mit der Schwere der Erkrankung in Beziehung zu setzen suchte. V. Frisch, der sich am meisten mit diesen Untersuchungen befasst hat, ist der Ansicht, dass es sehr schwer ist unter derartigen Bedingungen einwandfreie Resultate zu erhalten. Denn erstens darf man nicht bei fortgeschrittenen Phthisen, wegen der Gefahr einer zu starken Allgemeinreaktion, beliebige Mengen Tuberkulin injizieren, und zweitens erklären sich die Patienten nicht ohne weiteres dazu bereit, die für einen Grundumsatzversuch unbedingt nötige vorausgehende Fastenperiode einzuhalten. Um diesen Schwierigkeiten auszuweichen, wurden die folgenden Versuche an Tieren ausgeführt. Um zu erfahren, ob das Tuberkulin selbst eine stoffwechselsteigernde Wirkung besitzt ohne Zusammenhang mit einer im Körper befindlichen tuberkulösen Erkrankung, wurden nur gesunde Tiere verwendet. Die Ratte ist gegen die Tuberkuloseinfektion resistent. Sie eignet sich also zu solchen Versuchen besonders gut. Später wurden auch Meerschweinchen, die typischen Tuberkuloseversuchstiere, mit Alttuberkulin behandelt, um einen etwa vorhandenen Unterschied in ihrem Verhalten zu dem der Ratten festzustellen. Es zeigte sich (siehe unten), dass ein solcher nicht bestand.

Methodik: Es wurden keine weiblichen Tiere zu diesen Versuchen verwendet, da ihre Stoffwechselkurve durch den Menstruationscyclus zu ungleichmässig verläuft und darum nicht gestattet, exakte Schlüsse aus ihr zu ziehen. Die Versuchstiere bekamen stets die gleiche Nahrung, die bei den weissen Ratten aus Milch und Brot, bei den Meerschweinchen aus Milch und Rüben bestand. Der Grundumsatz wurde an der Grösse der Kohlensäureausscheidung mit der Apparatur von Thurnherr gemessen, die an der hiesigen Poliklinik vor einiger Zeit angegeben worden ist. Diese Apparatur fand bereits in mehreren Arbeiten und findet im Poliklinikbetrieb selbst Verwendung, da die Messungen damit sehr einfach und schnell auszuführen sind. Die Fehlerquelle beträgt nur ½%, ist also verhältnismässig niedrig. Es findet sich eine genaue Beschreibung dieser Methode in der Klinischen Wochenschrift, Jg. 5 1934. Exakte Kontrollversuche mit dieser Apparatur wurden von Seligmann ausgeführt. Das Wesent-

liche bei diesr Messung besteht darin, dass die Wärmemenge bestimmt wird, die entsteht, wenn beim Durchleiten des kohlensäurehaltigen Atemgemischs des Versuchstieres durch 33%ige Kalilauge, K_2CO_3 gebildet wird. Diese Wärmemenge ist direkt proportional der in der Atemluft enthaltenen Kohlensäure, und letztere kann daraus leicht errechnet werden. Auch die Vorrichtung, in der das Tier atmet, ist von Thurnherr angegeben worden, und hat den Vorteil, dass sie keine Ventile enthält, also eine ungestörte natürliche Atemarbeit, die Voraussetzung jeder Grundumsatzuntersuchung, gewährleistet. Das Tier sitzt in einem Exsiccator, der zwei Oeffnungen besitzt. Die eine dient dazu, frische Atemluft, die vorher zwecks Absorption der CO_2 durch Kalilauge geleitet wurde, zuzuführen. Durch die andere Oeffnung wird die Verbindung mit einer Mariotte' Flasche hergestellt, in der die Exspirationsluft zur Messung der in ihr enthaltenen Kohlensäure gesammelt werden soll. Die zuletzt genannte Oeffnung befindet sich nahe über dem Boden des Exsiccators, um die Kohlensäure, die schwerer ist als die übrige Luft und sich im unteren Teil des Atemraumes ansammelt, gut abzuleiten. Zu Beginn des Versuchs ist die Mariotte' Flasche mit Wasser gefüllt, welches später durch ihren unteren Ablauf langsam abgelassen wird. Dadurch wird ein luftverdünnter Raum in ihr erzeugt, der sich auf den Verbindungsschlauch mit dem Exsiccator und dann auf diesen selbst fortpflanzt und ein Ansaugen des in ihm enthaltenen Gasgemisches bewirkt. Gleichzeitig mit dem Ansaugen dieses Gasgemisches strömt durch die Waschflasche CO_2-freigemachte Aussenluft in den Exsiccator nach. CO_2 löst sich zu einem bestimmten Prozentsatz in Wasser. Um dieses zu vermeiden wurde statt dessen die Mariotte' Flasche mit 1%iger Schwefelsäure gefüllt. Wenn die ganze Flüssigkeit in einer bestimmten Zeit ausgelaufen ist und sich die Mariotte' Flasche mit dem von ihr angesaugten Gasgemisch gefüllt hat, braucht man sie nur luftdicht zu verschliessen (hier wurden zu diesem Zweck Klemmen am Ab- und Zuleitungsschlauch benutzt) und sie mit dem vorher beschriebenen Apparat zur Messung der CO_2 zu verbinden. Man misst so natürlich nur einen Teil der von dem Versuchstier in einer bestimmten Zeit ausgeschiedenen CO_2, der Rest ist im Exsiccator und seinem Verbindungsschlauch zur Mariotte' Flasche zurückgeblieben. Aus dem Inhalt des Gesamtatemraumes, dem Inhalt der Mariotte' Flasche und dem Prozentgehalt des in ihr vorhandenen Gasgemisches an CO_2, kann man aber die absolute CO_2 Ausscheidung des Versuchstieres während einer bestimmten Zeit leicht errechnen.

In den hier beschriebenen Grundumsatzbestimmungen dauerte die Atemzeit stets eine halbe Stunde. Um aber genauere Resultate zu erhalten, wurde schon etwa 20 Minuten vor jedem Experiment das Tier in den Exsiccator gesetzt und durch das Auslaufenlassen der Mariotte' Flasche das Vakuum, und damit das Nachströmen der Aussenluft in den Exsiccator erzeugt. Das eintönige Geräusch der Luftblasen in der (zwecks Absorption der Kohlensäure mit Kalilauge gefüllten) Waschflasche für die Aussenluft, schläferte das Tier ein. Erst wenn dieser Zustand eingetreten war, wurde die Mariotte' Flasche wieder angefüllt und mit dem eigentlichen Versuch begonnen. Auf diese Weise konnten Fehler durch ein unruhiges Verhalten des Tieres vermieden werden; denn erwachte das Tier vorzeitig, so wurde der Versuch abgebrochen und wieder frisch begonnen.

Tabelle 1.

Ratte	Datum	Gewicht gr	CO_2 Ausscheidung gr pro Kg/Std
A	14. 4. 34.	167	3,82
»	21. 4. 34.	186	3,75
»	24. 4. 34.	177	3,69
»	26. 4. 34.	174	3,63
»	4. 5. 34.	190	3,63
B	12. 4. 34.	230	3,40
»	21. 4. 34.	228	3,45
»	24. 4. 34.	231	3,35
»	26. 4. 34.	233	3,40
»	7. 5. 34.	240	3,37
C	11. 4. 34.	206	3,70
»	12. 4. 34.	202	3,75
»	20. 4. 34.	217	3,50
»	23. 4. 34.	213	3,69
»	25. 4. 34.	209	3,52
D	11. 4. 34.	238	3,52
»	12. 4. 34.	236	3,38
»	20. 4. 34.	240	3,40
»	23. 4. 34.	239	3,37
»	25. 4. 34.	232	3,58
E	11. 4. 34.	217	3,56
»	14. 4. 34.	216	3,59
»	20. 4. 34.	221	3,72
»	23. 4. 34.	219	3,58

Vor jeder Tuberkulininjektion wurde durch Messungen, die an verschiedenen Tagen ausgeführt wurden, festgestellt, dass die Tiere stets ungefähr die gleiche CO_2 Ausscheidung aufwiesen. Die grössten dabei erhaltenen Differenzen überstiegen nie 0,2 g CO_2 Ausscheidung pro kg Ratte in einer Stunde (siehe Tabelle 1). Für die Injektion wurde Alttuberkulin, verdünnt mit Ringerlösung, in den unten angeführten Konzentrationen benützt. Es wurde subcutan injiziert. Die Ratten wurden zu diesem Zweck in einen leichten Aetherrausch versetzt, die Meerschweinchen verhielten sich auch ohne das ruhig bei der Injektion. Trotz einiger sehr hoher Tuberkulindosen zeigten die Tiere keinerlei Störung ihres Allgemeinbefindens. Ihre CO_2 Ausscheidung verhielt sich wie folgt (siehe Tabelle 2). Es wurden der Kürze wegen nur die

Tabelle 2.

Tier	Zeit	Injektion ccm ATK	Gewicht gr	CO_2 Ausscheidung gr pro Kg/Std	Steigerung %
Ratte					
1. A	25. 5. 34. 11 h.		215	3,55	
		0,004			
	26. 5. 34. 11 h.		211	4,10	13,5
2. B	3. 7. 34. 11 h.		236	3,23	
		0,005			
	4. 7. 34. 11 h.		235	3,58	9,8
3. C	5. 7. 34. 9 h.		197	3,03	
		0,005			
	6. 7. 34. 9 h.		188	4,20	27,9
4. D	29. 5. 34. 14 h.		258	2,99	
		0,010			
	30. 5. 34. 14 h.		255	4,06	28,2
5. E	5. 7. 34. 10 h.		210	2,94	
		0,500			
	6. 7. 34. 10 h.		203	4,30	31,3
Meerschweinchen					
6. A	13. 7. 34. 12 h.		357	1,58	
		0,001			
	14. 7. 34. 12 h.		347	1,68	5,9
7. B	12. 7. 34. 10 h.		270	2,00	
		0,005			
	13. 7. 34. 10 h.		255	3,02	33,3
8. C	12. 7. 34 11 h.		351	1,53	
		0,500			
	13. 7. 34. 11 h.		333	2,59	41,8

Maximalwerte der CO_2 Ausscheidung angegeben, trotzdem mehrere Messungen vor und nach diesen Werten vorgenommen wurden. Wie aus der Tabelle hervorgeht, reagierten alle Tiere mit einer Steigerung ihrer CO_2 Ausscheidung, deren Maximum stets nach 24 Stunden erreicht war. Die Grösse der Steigerung steht ungefähr im Verhältnis zu der injizierten Tuberkulinmenge, d. h. sie wächst mit zunehmender Tuberkulinzufuhr. Nur Versuch 2 bildet aus unerklärlichen Gründen eine Ausnahme. Die Meerschweinchen verhielten sich ebenso wie die Ratten. Auch sie beantworteten die Alttuberkulininjektionen mit einem Anstieg ihrer CO_2 Ausscheidung, der sogar noch etwas höhere Werte erreichte als bei den Ratten. Die niedrigste Dosis (Schwellendosis), die noch einen Effekt ausübte, betrug dabei 0,001 g Alttuberkulin.

Tabelle 3.

Tier	Zeit	Injektion ccm ATK	Gewicht gr	CO_2 Ausscheidung gr pro Kg/Std
Ratte				
A	14. 6. 34. 9 h.		226	3,33
		0,04		
	15. 6. 34. 9 h.		223	3,33
B	7. 7. 34. 8 h.		248	3,29
		0,50		
	8. 7. 34. 8 h.		246	3,29
C	10. 7. 34. 8 h.		186	3,79
		0,50		
	11. 7. 34. 8 h.		185	3,39
D	3. 7. 34. 11 h.		263	2,90
		0,02		
	4. 7. 34. 11 h.		262	2,87
B	17. 7. 34. 10 h.		275	3,01
		1,00		
	18. 7. 34. 10 h.		273	3,10
Meerschweinchen				
A	16. 7. 34. 12 h.		357	1,76
		0,01		
	17. 7. 34. 12 h.		251	2,06
B	16. 7. 34. 11 h.			
		0,005		
	17. 7. 34. 11 h.		236	2,10
C	20. 7. 34 9 h.		325	1,56
		1,00		
	21. 7. 34. 9 h.		317	1,57

Alle Tiere wurden dann nach einiger Zeit zum zweiten Mal mit Alttuberkulin injiziert, und zwar dies Mal mit teilweise viel höheren Dosen. Die Ergebnisse gehen aus Tabelle 3 hervor: Es wurden wieder nur die entsprechenden, nach 24 Stunden gefundenen Werte angegeben, obwohl auch hier vor und nach ihrer Feststellung mehrere Messungen ausgeführt wurden. Man ersieht aus der Tabelle, dass nach der zweiten Injektion keinerlei Beeinflussung der CO_2 Ausscheidung mehr auftrat, obwohl, wie schon erwähnt, die injizierten Dosen bedeutend höher waren als vorher. Dass hier im Gegensatz zur ersten Injektion kein Einfluss der Tuberkulininjektion auf den Grundumsatz bestand, geht schon aus dem Verhalten der Gewichte der Tiere hervor. Vergleicht man die Gewichtszahlen der Tiere vor und nach jeder Injektion aus Tabelle 2 und 3 miteinander, so wird man feststellen, dass die Tiere zwar nach jeder Injektion an Körpergewicht verloren (was auf die jeder Messung vorausgehenden 15stündigen Fastenperiode zurückzuführen ist, dass jedoch die Gewichtsverluste bei den ersten Injektionen durch den gesteigerten Grundumsatz wesentlich grösser waren.

Wie lässt sich das eigenartige Verhalten der Tiere erklären, und wie weit stimmen die hier beschriebenen Ergebnisse mit denen anderer Untersuchungen überein?

Zunächst musste ausgeschlossen werden, dass das im Alttuberkulin enthaltene Glycerin die Stoffwechselsteigerung verursacht. Dieses wurde an den gleichen Tieren, bevor mit den Tuberkulin injektionen begonnen wurde, einwandfrei festgestellt.

	CO_2 Ausscheidung vor Glycerin	Menge des inj. Glycerins	CO_2 Ausscheidung 24 St. nach Glyc. Inj.
A.	3,68 g CO_2	0,5 ccm	3,63 g CO_2
B.	3,27 » »	1,0 »	3,29 » »
C.	3,71 » »	1,5 »	3,68 » »

Auch wird man jetzt den Gedanken, es handle sich bei der Steigerung der CO_2 Ausscheidung nach Tuberkulininjektion um einfache Proteinkörperwirkung, fallen lassen müssen, denn anderenfalls wäre ja nach einer zweiten Injektion wieder eine Reaktion aufgetreten (siehe z. B. wiederholte Grundumsatzsteigerungen nach mehrmaligen Milchinjektionen).

Alle Tiere wiesen nach der ersten Tuberkulininjektion eine Erhöhung ihrer CO_2 Ausscheidung auf, deren Maximum, unabhängig von der injizierten Tuberkulinmenge, stets nach 24 Stunden erreicht war. Ebenso stellte v. Frisch fest, dass seine tuberkulösen Patienten auf Alttuberkulin mit einem Temperatur-

anstieg reagierten und dass auch hier die Reaktionszeiten, unabhängig von der injizierten Menge, stets konstant waren. V. Frisch, der nur tuberkulöse Menschen untersuchte, erklärt dieses Verhalten aus der Zeitspanne, die das Tuberkulin braucht, um von der Injektionsstelle aus in den Erkrankungsherd einzudringen. Es muss sich aber dabei doch noch um einen anderen Vorgang handeln, denn unsere Tiere waren vollständig gesund, beherbergten also gar keinen Krankheitsherd. Vielleicht kommt man einer Erklärung näher, wenn man sich an den Einfluss erinnert, den die Stoffwechselprodukte der Tuberkelbazillen auf die Drüsen mit innerer Sekretion ausüben. Es ist bekannt, dass bei vorgeschrittenen Phthisen eine Hyperfunktion der Schilddrüse einsetzt, die von einigen Autoren für die starke Abmagerung der Tuberkulösen mit verantwortlich gemacht wird. Yoshimo hat Versuche angestellt, um einen Einfluss des Tuberkulins auf die Schilddrüse zu beweisen. Er injizierte weissen Ratten bis zu 60 Tage lang täglich 0,7 g Alttuberkulin. Bei der Sektion zeigten sich starke Veränderungen dieses Organs, stets im Sinne einer Hypertrophie. Ebenso berichten Mari, Shigeki und Ran Honda über starke Nebennierenveränderungen nach fortgesetzten Tuberkulininjektionen: « Das Gewicht dieser Organe stieg bis auf das Doppelte. » Bei einer derartigen Wirkung des Tuberkulins auf die beiden innersekretorischen Drüsen, deren Funktion in nächster Beziehung zur Steigerung des Grundumsatzes steht, liess sich die in dieser Arbeit beschriebene Steigerung der CO_2 Ausscheidung nach Tuberkulininjektion genügend erklären.

Warum aber war eine zweite Injektion wirkungslos? Vielleicht liegen diesem Verhalten noch komplizierte immunbiologische Vorgänge zu Grunde, die einen beschleunigten Abbau des Tuberkulins bei einer zweiten Injektion veranlassten. Das macht auch Versuch 6 aus Tabelle 2 wahrscheinlich. Die dort zu einer deutlichen Steigerung der CO_2 Ausscheidung zu geringe Tuberkulinmenge verhinderte doch das Zustandekommen einer Reaktion bei einer zweiten, 10mal so starken Dosis. Aus technischen Gründen konnten die Intervalle zwischen den beiden Injektionen auch nie grösser als 5 Wochen gewählt, und die Versuche nicht weiter fortgesetzt werden.

Die etwas unerwarteten und nicht ganz erklärlichen Ergebnisse dieser Arbeit werden vielleicht den Anlass bieten, die Wirkung des Tuberkulins vorerst noch mehr am gesunden Tier, als am kranken Menschen zu studieren, da bei letzterem die Reaktionsverhältnisse sehr viel komplizierter liegen.

Zusammenfassung: An Ratten und Meerschweinchen wurde die CO_2 Ausscheidung nach Alttuberkulininjektionen gemessen.

Nach den ersten Injektionen zeigte sich bei allen Tieren eine Steigerung der CO_2 Ausscheidung bis zu 40%, die in Abhängigkeit zur Höhe der jeweils injizierten ATK Menge stand.

Eine zweite Injektion, die innerhalb der folgenden fünf Wochen stattfand, hatte keinerlei Einfluss mehr auf die Höhe der CO_2 Ausscheidung.

Zum Schluss möchte ich noch meinem sehr verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. G i g o n, meinen allerherzlichsten Dank aussprechen, für die Ueberlassung des Themas und für sein stets vorhandenes Interesse, das er dieser Arbeit entgegengebracht hat.

Literatur-Verzeichnis

Frisch, A. v.: Studien zum Tuberkulinproblem. Beiträge zur Klinik der Tbc. Bd. 60, S. 155—162, 1925.

Mori, Shigeki, Ran Honda: Ueber krankhafte Veränderungen der Nebennieren von Meerschweinchen infolge ATK Zufuhr. Fol. endocrin. jap., Bd. 2; H. 5, S. 935—950, 1926 jap., entnommen aus d. Centralbl. f. d. ges. Tbc. Forsch., 1927.

Osawa, Masarn: Ueber den Einfluss des Tuberkulins auf die Adrenalinsekretion der Nebennieren. Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 101, 1924.

Rondoni, P.: Das Wesen der Tuberkulinreaktion. Tuberkulose 9, Bd. 9, S. 137—144, 1929.

Seibert and Munday: The chemical composition of the active principle of tuberculin. Americ. review of tuberculose, Bd. 13, 1926, Bd. 23, 1931.

Seligmann, W.: Ueber die Beeinflussung der Kohlensäureausscheidung und der Ventilationsgrösse durch Nahrungsaufnahme und Zufuhr von Salzen. Diss. Basel, 1935. Philographischer Verlag.

Thurnherr: Klinische Wochenschrift, Jg. 5, 1934.

Vogel-Eyseren: Beitr. z. Klinik der Tuberkulose, Bd. 57, 1924.

Yoshino, S.: Die histologischen Veränderungen der innersekretorischen Organe nach ATK Injektionen. Fol. endocrin. jap., Bd. 7, S. 36—37, 1931. Entnommen aus d. Centr. Bl. f. d. ges. Tuberk. Forsch., 1932.